Journal of Metallurgical and Materials Engineering, 35, 3. 2024.(35-50)

Ferdowsi University of Mashhad

Journal of Metallurgical and Materials Engineering

https://jmme.um.ac.ir

Iron&Steel Society of Iran

Preparation of a Bilayer Coating of Hydroxyapatite/Poly (lactic-co-glycolic) acid on Mg and Investigation of Corrosion Properties and Biocompatibility

Research Article

Mina Mohammadi Bardizadeh [1], Neda Aboudzadeh [2], Alireza khavandi [3], Alireza Eivani [4]

DOI: 10.22067/jmme.2024.83920.1121

1. Introduction

The similar mechanical properties of magnesium and its alloys to natural bone, along with their appropriate biodegradability, make them promising candidates for orthopedic implant applications. However, there are concerns regarding their poor corrosion resistance. Purification, alloying, and surface coating are among the measures taken to control the corrosion rate of magnesium. Among these methods, one of the simplest and most practical ways is by modifying the surface and applying a coating. Bioceramics and biopolymers have been widely recognized as the most effective coatings in recent years. However, it should be kept in mind that each material has its own set of pros and cons. Therefore, in order to effectively control the degradation of magnesium and enhance its biocompatibility and bioactivity, two-layer or composite ceramic-polymer coatings have been developed. These coatings aim to combine the superior bioactivity of ceramics with the flexibility of polymers. Few research have been conducted in this regard, for example, Diez et al. reported that HA/PLLA dual coating could protect the WE43 substrate from corrosion and provide better biological performance than the substrate. However, there are few reports on the surface modification of Mg alloys through double-layered bioceramic polymers, especially coating by electrochemical deposition method. In this research, we created a bilayer nHA-PLGA coating on pure magnesium. HA, as a bioactive layer, is electrodeposited on Mg to protect the surface. Afterward, PLGA is applied to prolong the integrity of the HA coating. The aim of this study is to decrease the rate of magnesium degradation and enhance its biocompatibility by developing nHA-PLGA coating using the pulsed electrodeposition technique, followed by immersion in the polymer solution.

2. Experimental

The Mg samples were cut into cylindrical shapes. Then, they were ground and cleaned using ultrasonic. Afterward, the samples were immersed in a solution of nitric acid. In the end, they were rinsed and dried. To prepare the electrolyte, 0.025 mol/L of $NH_4H_2PO_4$ and 0.042 mol/L of $Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$ salts were added to distilled water as sources of calcium (Ca) and phosphorus (P). Additionally, 0.1 mol/L $NaNO_3$ solution was used as a conductive agent. The pH of the final solution was adjusted to five. The current density, duty cycle, and plating time (t_{on}) were set to 40 mA/cm², 0.1, and 10 milliseconds, respectively. The pulse electrodeposition was carried out using the electrochemical workstation (SL10/120PRCT) at 75°C for 30 min. After the coating process, the samples were removed, rinsed and air-dried.

To apply a polymer coating on top of the HA coatings, PLGA was dissolved in DCM. The samples coated with hydroxyapatite (Mg-H) were dip-coated for one min and the double-coated samples (Mg-HPL) were prepared. Several uncoated Mg samples were also coated with a PLGA layer (Mg-PL) for further testing.

Phase characterization of the coating was identified using XRD. The surface morphology and coat thickness were analyzed using SEM.

Potentiodynamic polarization test was conducted to compare the corrosion behavior of samples. The test was performed in SBF. For this purpose, a conventional three-electrode system was used. The test was conducted at a scan rate of 1 mV/s and within a potential range of -200 to 500 mV, relative to the OCP value. The corrosion current density, corrosion potential, and anodic and cathodic Tafel slopes were obtained from the polarization curves.

For biocompatibility studies, the indirect contact method was used in the MTT assay. The extraction process was conducted by the ISO 10993-12 standard. MC3T3 cells were cultured in cell culture plates and then their medium was completely replaced with extracts. After the specified culture period, the medium was removed and MTT was added to each well and incubated for 4 hours.

Manuscript received: August 13, 2023, Revised, January 24, 2024, Accepted, May 1, 2024.

[1] Ms. Student, School of Metallurgy and Materials Engineering, Iran University of science and Technology, Tehran, Iran.

[2] Corresponding authors: PhD researcher, School of Metallurgy and Materials Engineering, Iran University of science and Technology, Tehran, Iran, **Email**: aboudzadeh@iust.ac.ir.

[3] Professor, School of Metallurgy and Materials Engineering, Iran University of science and Technology, Tehran, Iran.

[4] Associate professor, School of Metallurgy and Materials Engineering, Iran University of science and Technology, Tehran, Iran.

Then the medium was removed from the cells and isopropanol was added to dissolve the purple crystals. The absorbance was obtained with an ELISA plate reader.

3. **Results** and **discussion**

The XRD patterns of pure Mg and Mg-H are shown in Fig. 1, indicating the successful formation of HA coatings on Mg. HA coating was deposited on Mg according to the equations (1) and (2).

$$2H_2O + 2e^- \rightarrow 2OH^- + H_2\uparrow \quad (1)$$

$$10Ca^{2+} + 6PO_4^{3-} + 2OH^- \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH_2) \quad (2)$$

SEM surface micrographs, element compositions, and elemental mapping of the HA coating are shown in Fig. 2. The coat demonstrated complete coverage of the metal. Fig. 2 show the porous and blade-shaped morphology of the coating. According to Park et al., this morphology is suitable for bone growth.

The uniform coating of PLGA on Mg and Mg-H is shown in Fig. 3. As can be seen in Fig. 3 (a, b), the entire surface area of the substrate is covered by PLGA without any cracks.

Fig. 4(a) reveals that the thickness of the HA coating is approximately 22.29 µm. Fig. 4 (b) displays the appropriate connection between the HA and PLGA layers, with a thickness of 31/58 µm. It has been proven that the corrosion resistance of a coating is directly related to its thickness and density.

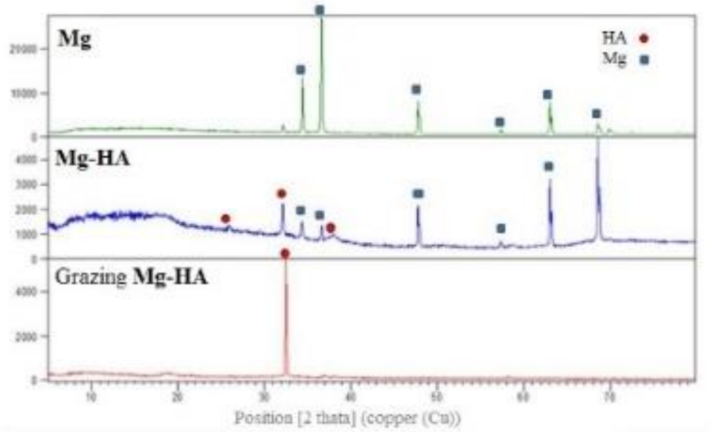


Fig. 1. XRD patterns of the Mg substrate and the HA-coated.

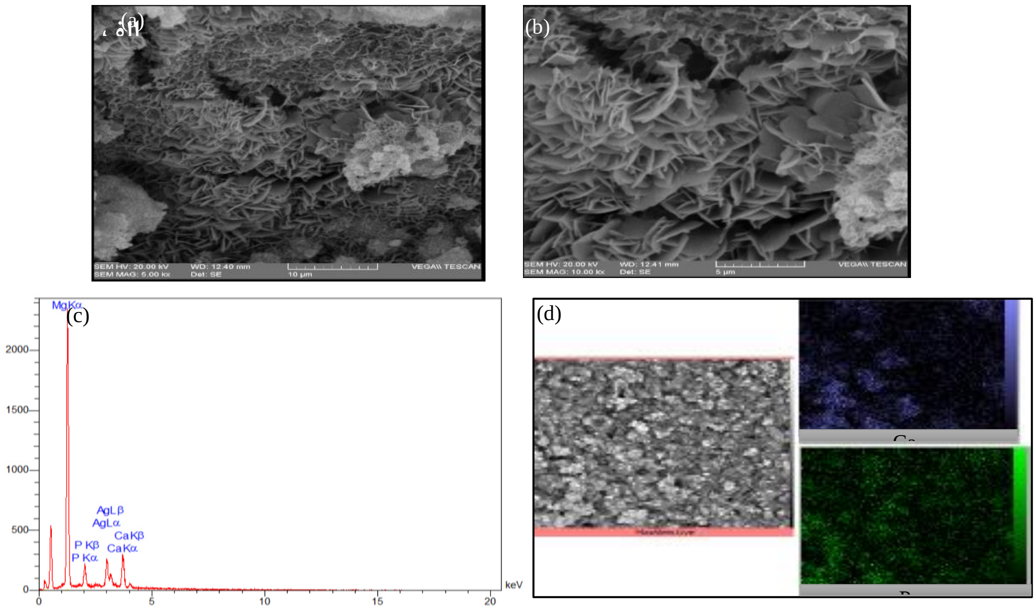


Fig. 2. SEM images of HA coating, (a) 500×, (b) 1000×, (c) EDS spectrum of HA coating, and (d) Elemental map of P and Ca on HA coating.

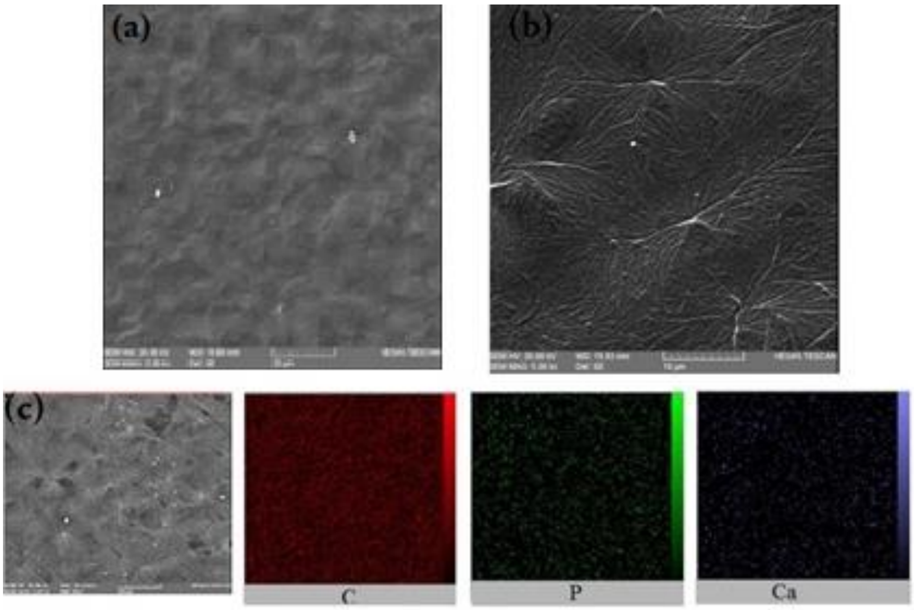


Fig. 3. SEM images of the surface of (a) Mg-PL sample (500×) (b) Mg-HPL sample (500×) (c) elemental distribution map of Mg-HPL sample.

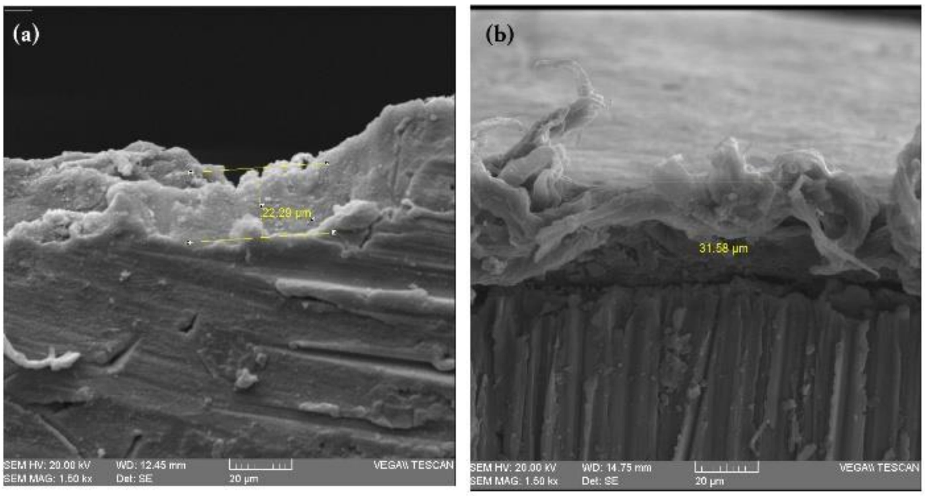


Fig.4. Cross section of (a) Mg-H (b) Mg-HPL samples.

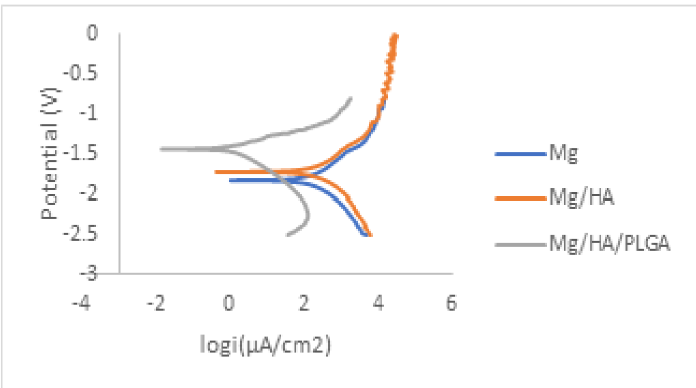


Fig.5. Potentiodynamic polarization curves of Mg, Mg-H and Mg-HPL samples in SBF solution.

TABLE 1: Electrochemical parameters of samples calculated from polarization curves.

Specimen name	Corrosion current density i_{corr} (μA/cm^2)	Corrosion potential E_{corr} (V)	Cathodic Slope β_c(V.dec^{-1})	Anodic Slope βa(V.dec^{-1})
Mg	2.3	-1.82	0.39	0.38
Mg-H	2.19	-1.71	0.41	0.39
Mg-HPL	0.37	-1.4	0.37	0.1

Potentiodynamic polarization curves of samples are shown in Fig. 5. The values of I_{corr} and E_{corr} have been listed in Table 1. It can be seen that the corrosion current density of Mg (2.3 µA/cm²) was higher compared to Mg-H (2.19 µA/cm²) and Mg-HPL (0.37 µA/cm²). The corrosion potential of Mg-HPL was found to be shifted to a nobler value (-1.4 V) compared to Mg-H (-1.71 V) and Mg (-1.82 V). This shift indicates a significant improvement in the corrosion resistance of Mg-HPL.
The cell viability percentages for MC3T3 in the vicinity of different sample extractions after 24 hours, compared to the control sample, are shown in Fig. 6. It can be seen that the biocompatibility of pure Mg, Mg-H, and Mg-HPL is close to 70%, 89%, and 99%, respectively. According to ISO 10933-5, if the percentage of cell viability is higher than 70%, the material is considered biocompatible.

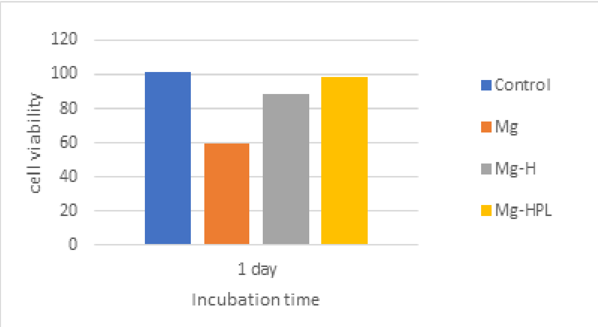


Fig.6. Absorbance results of MC3T3 proliferation in the vicinity of Mg, Mg-H and Mg-HPL extractions.

4. Conclusions

In this research, a double-layer coating of HA and PLGA was applied to Mg using electrodeposition and dip coating methods in order to enhance its corrosion resistance and biocompatibility. The samples underwent phase and structural analysis. Polarization test was conducted and according to the results, applying a double-layer coating on Mg increases the corrosion resistance of the substrate by up to 15 times. The MTT test also showed that there was no toxicity in the extract prepared from the samples.

مهندسی متالورژی و مواد، ۳۵، ۳، ۱۴۰۳. (۵۰-۳۵)

مهندسی متالورژی و مواد

https://jmme.um.ac.ir/

انجمن آهن و فولاد ایران

دانشگاه فردوسی مشهد

ایجاد پوشش دولایه nHydroxyapatite/Poly(lactic-co-glycolic)acid بر منیزیم و بررسی خواص خوردگی و زیست‌سازگاری*

مقاله پژوهشی

مینا محمدی بردیزاده(۱) ندا عبودزاده(۲) علیرضا خاوندی(۳) علیرضا ایوانی(۴)

DOI: 10.22067/jmme.2024.83920.1121

چکیده در این تحقیق با هدف کنترل خوردگی و امکان کاربرد کلینیکی منیزیم، پوشش دولا یه هیدروکسی‌آپاتیت -پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک اسید به ترتیب با روش های رسوب دهی الکتریکی و غوطه وری بر نمونه منیزیمی اعمال گردید. مشخصه‌یابی پوشش‌ها با کمک پراش پرتو ایکس و میکروسکوپ الکترونی روبشی، نشان دهنده تشکیل یکنواخت پوشش ها با ضخامت ۳۰ – ۲۰ µm بر سطح منیزیم است. آزمون الکتروشیمیایی پلاریزاسیون تافل بر نمونه‌ها نشان داد که با اعمال پوشش دو لا یه هیدروکسی‌آپاتیت- پلی‌لاکتیک گلایکولیک اسید بر منیزیم، پتانسیل خوردگی از ۱/۸۲ V- به ۱/۴ V- افزایش و چگالی جریان خوردگی از ۲/۳ $\mu A/cm^2$ به ۰/۳۷ $\mu A/cm^2$ کاهش می‌یابد. نتایج آزمون MTT نیز نشان داد که مقدار تکثیر سلولی در مجاورت عصاره ۴۸ ساعته نمونه‌های منیزیمی با پوشش دو لا یه بیشتر شده است، که حکایت از کاهش مقدار یون آزاد شده از سطح منیزیم با کمک اعمال این پوشش ها است.

واژه‌های کلیدی منیزیم، هیدروکسی‌آپاتیت، پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک‌اسید، زیست‌سازگاری، خوردگی.

Preparation of a Bilayer Coating of nHydroxyapatite/Poly(lactic-co-glycolic)acid on Mg and Investigation of Corrosion Properties and Biocompatibility

Mina Mohammadi Bardizadeh Neda Aboudzadeh Alireza khavandi Alireza Eivani

Abstract *In this study, intending to control the corrosion of magnesium and its clinical application, a double-layer coating of Hydroxyapatite- Poly lactic-co-glycolic acid was applied on Mg by means of electrodeposition and dip method, respectively. X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM) are used to characterize the phase and morphology of the coatings. The results show a homogeneous coating with a thickness of 20-30 µm. Potentiodynamic polarization of the samples revealed that the double-layer coating exhibited a significant increase in corrosion potential, ranging from -1.82 to -1.4 V, and a decrease in corrosion current, ranging from 2.3 to 0.37 $\mu A/cm^2$. Moreover, the MTT assay of the samples revealed that the amount of cell proliferation in the vicinity of the 48-hour extract of magnesium samples with double-layer coating had increased, indicating a decrease in the amount of ions released from the surface of magnesium by applying this coating.*

Keywords Magnesium, Hydroxyapatite, Poly lactic-co-glycolic acid, Double-layer coating, Corrosion, Biocompatibility.

* تاریخ دریافت مقاله ۱۴۰۲/۵/۲۲و تاریخ پذیرش آن۱۴۰۳/۲/۱۲ می‌باشد.

(۱) دانشجو کارشناسی ارشد دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران

(۲) نویسندهٔ مسئول، دکتری مهندسی مواد، دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران.

Email: aboudzadeh@iust.ac.ir

(۳) استاد دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران.

(۴) دانشیار دانشکده مهندسی مواد و متالورژی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران.

مقدمه

منیزیم و آلیاژهای آن، به دلیل اینکه چگالی، مدول الاستیک و چقرمگی شکست نزدیک به استخوان دارند و از پدیده‌ی سپر تنشی (Stress shielding) و خطر پوکی استخوان جلوگیری می‌کنند، گزینه مناسبی در زمینه تجهیزات ارتوپدی هستند [1,2]. ایمپلنت‌های منیزیمی باید به نحوی مهندسی شوند که در طول مدت زمان ترمیم استخوان (۱۲ تا ۱۸ هفته)، یکپارچگی مکانیکی خود را در بدن حفظ کنند و پس از آن تخریب شوند یا با بافت طبیعی استخوان جایگزین شوند [2,3]. منیزیم و آلیاژهای آن به دلیل فعالیت بالای الکتروشیمیایی و پتانسیل خوردگی کم، مستعد واکنش با یون‌های کلرید در مایعات بدن هستند، در نتیجه سرعت تخریب بالایی در پلاسمای خون و مایعات بدن دارد، لذا ممکن است در طول درمان، خواص مکانیکی آن تحلیل رود [2,4,5]. از جمله تمهیداتی که برای کنترل نرخ خوردگی منیزیم و در نتیجه بهبود زیست‌سازگاری آن در نظر گرفته شده است، خالص‌سازی[۶]، آلیاژسازی و پوشش‌دهی سطح [7] است. از این میان، اصلاح سطح و نشاندن پوشش بر منیزیم و آلیاژهای آن یکی از ساده‌ترین و کاربردی‌ترین روش‌ها برای کاهش تماس آن با محیط خورنده و در نتیجه کاهش سرعت تخریب اولیه آن است که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است [8-10].

از بهترین پوشش‌های مورد استفاده برای منیزیم در سال‌های اخیر، بیوسرامیک‌ها و بیوپلیمرها بوده اند. اما باید در نظر داشت که هر ماده به تنهایی مجموعه‌ای از جوانب مثبت و منفی دارد. به عنوان مثال بیوسرامیک‌های کلسیم فسفاتی که معروف‌ترین فاز آن هیدروکسی آپاتیت است [11]، سازگاری سلولی بالایی دارد و باعث تحریک تشکیل استخوان جدید می‌شود [12]. همچنین این ماده پایداری بالایی در محیط‌های فیزیولوژیکی از خود نشان داده و باعث افزایش مقاومت به خوردگی و سایش منیزیم و آلیاژهای آن شده است [13,14]. لیکن این ماده با چالش‌هایی روبرو است: از جمله اینکه بسیار ترد و شکننده است و تحت تنش‌های مکانیکی تغییر شکل پلاستیک کمی از خود نشان می‌دهد که در نتیجه زمانی که فشار مکانیکی قابل توجهی در طی عملیات جراحی و یا پس از کاشت بر روی ایمپلنت ایجاد می‌شود، لایه‌های پوشش کلسیم فسفاتی از جمله HA که بر روی آن نشانده شده است، به شدت در معرض ترک‌خوردگی قرار می گیرند [15]. در این مسیر، استفاده از بیوپلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر، از جمله پلی L–لاکتید اسید (PLLA)، پلی لاکتید گلایکولید اسید (PLGA) و پلی کاپرولاکتون (PCL)، به تنهایی به عنوان پوشش نیز مزایا و معایبی وجود دارد، از جمله اینکه، بر خلاف سرامیک‌های کلسیم فسفاتی مانند HA، انعطاف‌پذیری بالایی دارند و فشارهای مکانیکی اعمال شده بر ایمپلنت فلزی را بهتر تحمل می‌کنند [16]. لیکن اغلب به دلیل چسبندگی و پیوند نسبتا ضعیف بین پوشش پلیمری و ایمپلنت‌های منیزیمی، جدایش لایه‌ای در سطح ایمپلنت اتفاق می‌افتد و این موضوع باعث می‌شود این ایمپلنت‌ها در برابر خوردگی تهاجمی محافظت نشوند [17]. بنابراین برای کنترل موفقیت‌آمیز تخریب منیزیم و افزایش زیست‌سازگاری و زیست‌فعالی آن باید بر چالش‌های عیوب مواد پوششی غلبه کرد. به همین دلیل پوشش‌های دولایه و یا کامپوزیتی سرامیک–پلیمر روی آلیاژهای منیزیم توصیه شده‌اند که هم زیست‌فعالی عالی سرامیک‌ها و هم انعطاف‌پذیری بالای پلیمرها را به همراه دارند.

تحقیقات کمی در زمینه پوشش های دو لایه بر منیزیم انجام شده است، به عنوان مثال، در تحقیق انجام شده توسط دیاز و همکاران [18] پوشش دولایه HA/PLLA بر زیرلایه WE43 به روش ابتدا مستقیم با واکنش شیمیایی برای HA و سپس غوطه‌وری برای PLLA ایجاد گردید، نتایج تحقیق آنها نشان داد مقاومت خوردگی بهتری با ایجاد پوشش حاصل گردید. همچنین بخششی راد و همکاران [19] نشان دادند پوشش دولایه nHA/PCLایجاد شده به روش رسوب‌دهی الکتریکی و سپس غوطه‌وری، بر Mg-Ca سرعت تخریب را در شرایط آزمایشگاهی کاهش خواهد داد. با این حال، مطالعات کمی در مورد اصلاح سطح آلیاژهای منیزیم توسط پوشش دولایه سرامیک– پلیمر، به ویژه پوشش‌دهی شده به روش رسوب‌دهی الکتروشیمیایی گزارش شده است. روش رسوب‌دهی الکتریکی دارای مزایای منحصر به فردی است، که از آن جمله می توان به امکان تشکیل یک پوشش یکنواخت بر روی یک بستر متخلخل یا پوششی با شکل پیچیده، که در ایمپلنت های بیومتریال رایج است، اشاره کرد. علاوه بر این، کنترل ضخامت و ترکیب شیمیایی پوشش با تنظیم پارامترها از دیگر مزایای این روش است. در این پژوهش، یک پوشش دولایه nHA-PLGA بر روی منیزیم خالص ایجاد گردید تا پوشش بهتری در مقایسه با پوشش nHA یا پوشش PLGA به تنهایی، باشد. PLGA با این امید انتخاب شد که

ساختار یکنواخت آن می‌تواند به حفظ یکپارچگی پوشش HA برای مدت طولانی‌تری کمک کند. در مقابل HA می‌تواند از تماس مستقیم PLGA و زیرلایه منیزیمی و در نتیجه تعامل منفی آن‌ها جلوگیری کند. علاوه بر این PLGA با زیست‌سازگاری خوب باعث می‌شود این پوشش ترکیبی یک حامل دارویی امیدوارکننده نیز باشد. بنابراین هدف از این کار کاهش سرعت تخریب منیزیم و افزایش زیست‌سازگاری آن با ایجاد پوشش دولایه nHA-PLGA از طریق روش رسوب‌دهی الکتریکی پالسی و سپس غوطه‌وری در محلول پلیمری است.

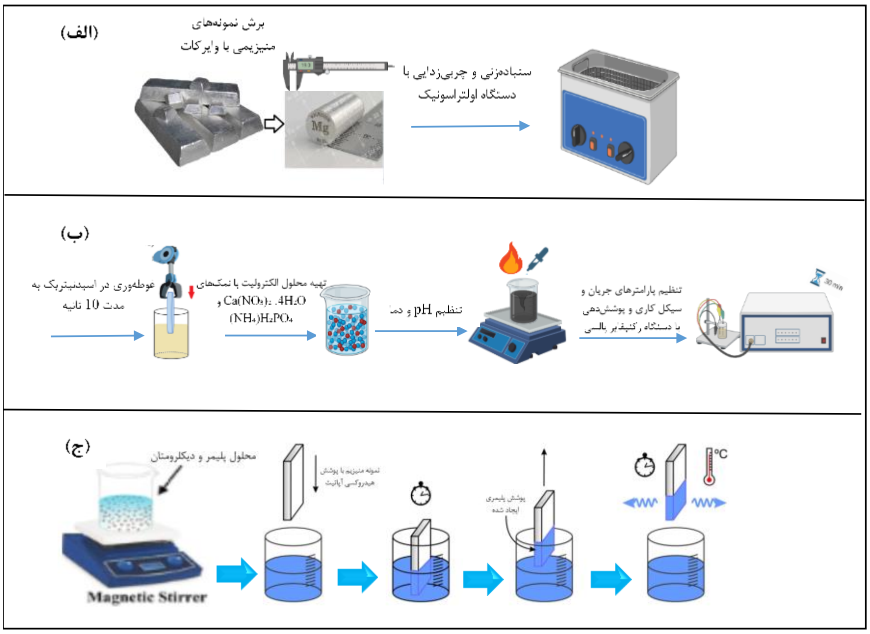
مواد و روش تحقیق

آماده‌سازی نمونه

مراحل مختلف اعمال پوشش در شکل (۱) به طور شماتیک نشان داده شده است. ابتدا نمونه‌های منیزیم خالص به شکل استوانه با قطر ۱۰ میلیمتر و ضخامت ۱۰ میلیمتر، با کمک دستگاه وایرکات برش داده شد و توسط سمباده از جنس SiC از ۴۰۰ تا ۱۲۰۰ سمباده‌زنی شد. جهت چربی‌زدایی از سطح به مدت ۳ دقیقه در استون توسط دستگاه اولتراسونیک شسته شد. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۱۰ ثانیه در محلول اسید نیتریک (HNO_3) جهت فعالسازی سطح، غوطه‌ور شدند. در پایان نمونه‌ها با آب مقطر شسته و خشک شدند.

اعمال پوشش هیدروکسی‌آپاتیت به روش رسوب‌دهی الکتریکی پالسی

جهت ایجاد پوشش nHA بر نمونه‌های منیزیمی آماده شده، ابتدا الکترولیت تهیه شد. بدین منظور، مقدار ۰/۰۲۵ mol/l از نمک $NH_4H_2PO_4$ به عنوان منبع فسفر و مقدار ۰/۰۴۲ mol/l از نمک $Ca(No_3)_2 .4H_2O$ به عنوان منبع تامین کننده کلسیم به آب مقطر اضافه گردید. در الکترولیت مذکور از نمک $NaNO_3$ به عنوان عامل رسانا در الکترولیت استفاده شد و pH محلول نهایی نیز با استفاده از دستگاه pH متر و با افزودن آمونیاک و اسید نیتریک رقیق بر عدد ۵ تنظیم گردید. چگالی جریان، سیکل کاری و زمان آبکاری به ترتیب ۴۰ میلی آمپر بر سانتیمتر مربع، ۰/۱ و ۱۰ میلی ثانیه تنظیم شد. برای ایجاد پوشش از دستگاه رکتیفایر پالسی مدل SL10/120PRCT استفاده شد. الکترودهای گرافیتی به قطب آند و نمونه بدون پوشش به قطب کاتد دستگاه متصل شده و در محلول الکترولیت در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ دقیقه پوشش دهی انجام شد. در حین فرآیند پوشش‌دهی از یک همزن مغناطیسی و حمام آب جهت یکنواختی محلول و دمای آن استفاده شد. پس از اتمام عملیات پوشش دهی، نمونه‌ها از داخل محلول خارج، با آب مقطر شسته و به مدت ۲۴ ساعت در هوا خشک شدند.



شکل ۱ شماتیکی از مراحل مختلف پوشش دهی (الف) آماده سازی نمونه (ب) ایجاد پوشش nHA (ج) ایجاد پوشش PLGA

اعمال پوشش پلیمری به روش غوطه‌وری

جهت ایجاد پوشش پلیمری بر نمونه‌های پوشش داده شده در مرحله قبل، پلی لاکتید گلایکولید اسید (PLGA) با وزن مولکولی ۶۰۰۰۰–۳۰۰۰۰ (ساخت شرکت سیگما) در دی‌کلرومتان با غلظت ۱۰ درصد حل شد. نمونه‌های با پوشش هیدروکسی‌آپاتیت (Mg-H)، در محلول پلیمری ذکر شده در دمای اتاق و به مدت یک دقیقه غوطه‌ور شدند و سپس خارج شده و در دمای اتاق خشک شدند و بدین ترتیب نمونه‌های (Mg-HPL) تهیه شدند.

مشخصه‌یابی نمونه های منیزیمی پوشش داده شده

آنالیز ساختاری. فازیابی پوشش با روش تکنیک پراش پرتو ایکس (XRD) و با استفاده از دستگاه X'Pert PRO MPD انجام گرفت. مورفولوژی سطح، ضخامت و ترکیب عناصر موجود در نمونه‌های پوشش‌دار، با بکارگیری دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM: TESCAN VEGA Czech) با ولتاژ شتاب‌دهنده ۳۰kV که مجهز به طیف‌سنجی پراش انرژی اشعه ایکس نیز بود، انجام گردید.

آنالیز خوردگی. جهت بررسی و مقایسه رفتار خوردگی پوشش‌ها و نمونه بدون پوشش، از روش پولاریزاسیون پتانسیودینامیکی استفاده شد. این آزمایش در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) تهیه‌شده طبق روش کوکوبو انجام شد. برای این منظور یک سیستم سه الکترودی مرسوم به کار گرفته شد. در این سیستم کالومل اشباع (SCE) به عنوان الکترود مرجع، پلاتین به عنوان الکترود کمکی و نمونه مورد بررسی به عنوان الکترود کاری، مورد استفاده قرار گرفت. پولاریزاسیون پتانسیودینامیک برای نمونه‌های پوشش‌دار و بدون پوشش در نرخ روبش ۱ میلی ولت بر ثانیه و در محدوده پتانسیل ۲۰۰– تا ۵۰۰+ میلی ولت نسبت به پتانسیل مدار باز (OCP)، انجام گرفت. و در انتها چگالی جریان و پتانسیل خوردگی و شیب‌های تافل آندی و کاتدی، از منحنی‌های پولاریزاسیون بدست آمد.

آنالیز سمیت سلولی. برای بررسی سمیت نمونه‌ها، روش غیر مستقیم عصاره‌گیری انتخاب شد. فرآیند عصاره گیری بر اساس استاندارد ۱۲ ISO-۱۰۹۹۳ انجام شد که طی آن ابتدا نمونه‌ها با استفاده از اتوکلاو استریل شده و سپس هر نمونه به طور جداگانه در محیط کشت DMEM با گلوکز بالا همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS; Gibco) اضافه شد و سپس در فاصله زمانی ۴۸ ساعت محیط خارج و نگهداری شد. در ادامه سلول‌های MC3T3 به مدت ۲۴ ساعت در محیط‌های کشت سلولی کشت داده شدند و محیط آن‌ها با عصاره‌ها جایگزین شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. چاهک‌های بدون عصاره به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. بعد از گذشت مدت مشخص شده محیط کشت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در هر چاهک ریخته شد و مجددا به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. پس از گذشت ۴ ساعت، محلول روی سلول‌ها خارج و ایزوپروپانول به آنها اضافه شد تا بلورهای بنفش رنگ ایجاد شده حل شوند. جهت انحلال بهتر رسوب MTT، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه مخلوط کن قرار گرفت. سپس مقدار غلظت ماده حل شده در ایزوپروپانول با استفاده از دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر محاسبه شد. تست برای هر نمونه سه بار تکرار شد. با کمک رابطه زیر میزان سمیت و توانایی زندگی سلول‌ها در مجاورت عصاره نمونه های تهیه شده محاسبه و با نمونه شاهد مقایسه گردید.

$$\text{cell viability} = \frac{\text{OD sample}}{\text{OD control}} \times 100$$

نتایج و بحث

آنالیز ساختاری

الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) منیزیم خالص و سطح پوشش هیدروکسی آپاتیت روی نمونه منیزیمی به روش رسوب‌دهی الکتریکی پالسی در شکل (۲) نشان داده شده است و نشانگر حضور HA بر زیر لایه منیزیم خالص است. همانگونه که مشاهده می شود، به دلیل تخلخل و ضخامت اندک پوشش، پیک های مربوط به منیزیم در الگوی آنالیز نمونه پس از پوشش هم ظاهر شده‌است.

در حین رسـوب‌دهی الکتریکی و اعمال ولتاژ، واکنش های زیر در سطح کاتد (منیزیم) غوطه‌ور در الکترولیت ممکن ا ست رخ دهد [20]، که در نتیجه آنها، pH موضـــعی الکترولیت در اطراف کاتد افزایش می‌یابد.

$$O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^- \quad (۱)$$

$$2H_2O + 2e^- \rightarrow H_2 + 2\,OH^- \quad (۲)$$

$$2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2 \quad (۳)$$

نمک فسفاتی مورد استفاده در الکترولیت نیز با اعمال جریان در آب طی واکنش های (۴-۶) تجزیه می‌شود و سبب ایجاد یونهای HPO_4^{2-} و PO_4^{3-} می شود.

$$H_2PO_4^- \rightarrow HPO_4^{2-} + H^+ \quad (۴)$$

$$HPO_4^{2-} \rightarrow PO_4^{3-} + H^+ \quad (۵)$$

$$H_2PO_4^- \rightarrow PO_4^{3-} + 2H^+ \quad (۶)$$

افزایش pH اطراف الکترود نیز می تواند طی واکنش های (۷-۸) نیز منجر به تجزیه نمک فسفاتی در مجاورت الکترود گردد:

$$H_2PO_4^- + OH^- \rightarrow HPO_4^{2-} + H_2O \quad (۷)$$

$$HPO_4^- + OH^- \rightarrow PO_4^{3-} + H_2O \quad (۸)$$

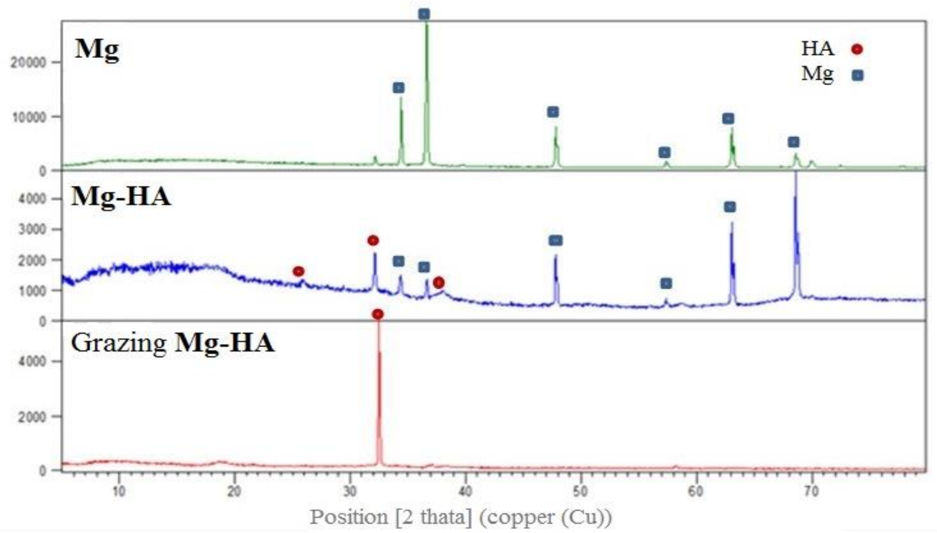
در حین رسوب‌دهی، یون‌های موجود در الکترولیت مثل Ca^{2+} (که از تجزیه نمک کلسیمی در آب ایجاد شده است) و H^+، به دلیل شیب میدان الکتریکی، به سمت کاتد حرکت می‌کنند، در حالی که یون‌های HPO_4^{2-} موجود، به دلیل غلظت متفاوت بین سطح کاتد و الکترولیت بالک، در لایه نفوذ باقی می‌مانند. با افزایش فاصله از سطح الکترود غلظت این یونها ممکن است افزایش یابد. غلظت متفاوت می‌تواند به عنوان نیروی محرکی برای یون‌های HPO_4^{2-} عمل کند تا از طریق الکترولیت بالک به سمت لایه نفوذ، انتشار یابد تا به سطح کاتد برسد. یون‌های کلسیم با یون‌های HPO_4^{2-} و PO_4^{3-} واکنش می‌دهند تا فازهای مختلف کلسیم فسفاتی را تشکیل دهند. مثل DCPD، OCP، HA_P و TCP [21].

$$Ca^{2+} + HPO_4^{2-} + 2H_2O \rightarrow CaHPO_4.\ 2H_2O\ (DCPD) \quad (۹)$$

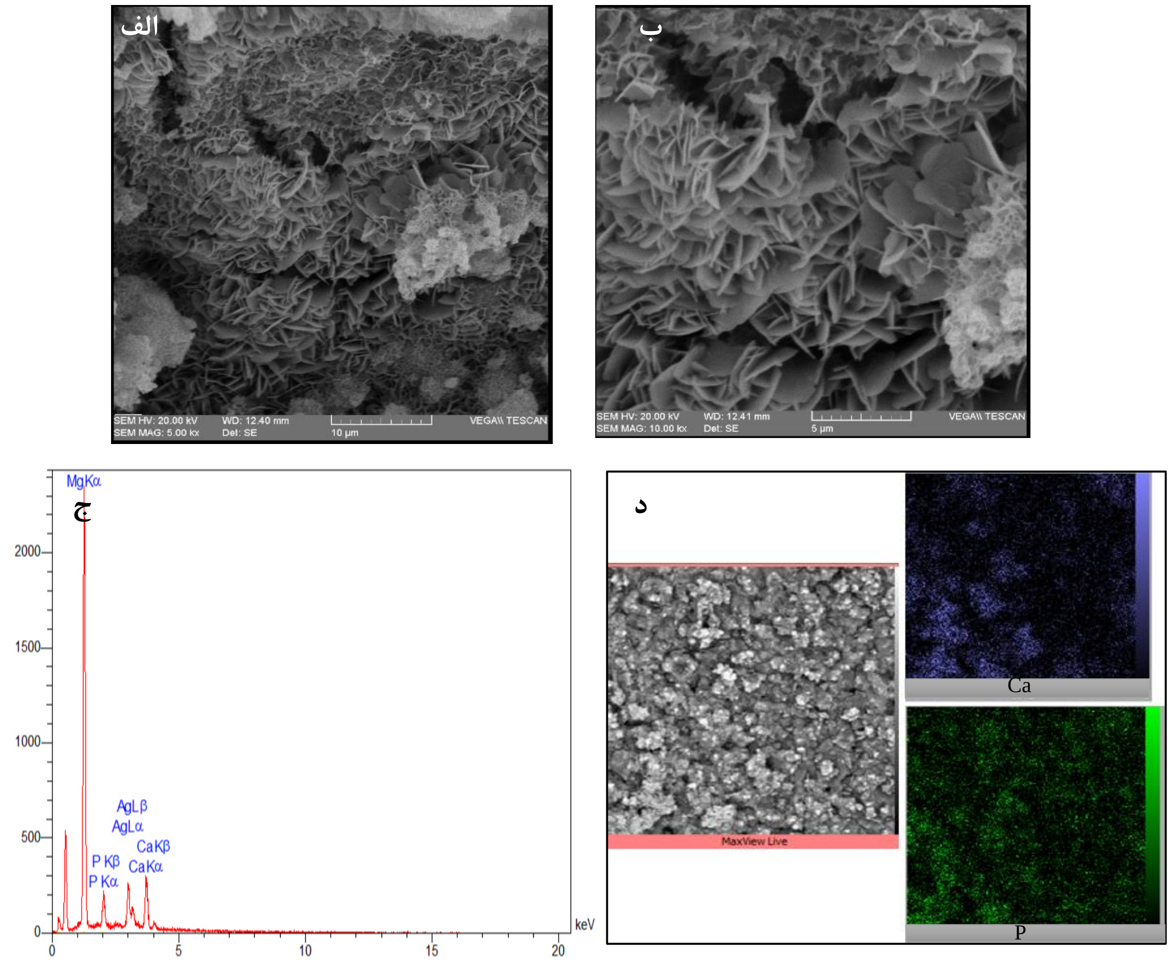
$$5Ca^{2+}\ 3PO_4^{3-} + OH^- \rightarrow Ca_5\ (PO_4)_3(OH)\ (HA_P) \quad (۱۰)$$

همانگونه که در نتایج حا صل از آنالیز فازی پو شش ن شان داده شده است، پارامترهای تعیین شده برای پوشش دهی منتهی به رسوب فاز کلسیم فسفاتی، هیدروکسی آپاتیت بر سطح منیزیم شده است.

ریزساختار سطح منیزیم با پوشش هیدروکسی‌آپاتیت و تجزیه عنصری (EDS) و نقشه عنصری (MAP) آن در شکل (۳) نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، پوشش‌دهی به صورت یکنواخت انجام شده و عاری از هرگونه ترک است. تصویرها در شکل (۳) نشان می دهند که ساختار پوشش متخلخل با مورفولوژی تیغه‌ای شکل است، که طبق تحقیقات دیگر پژوهشگران مورفولوژی مناسبی جهت رشد استخوان و در نتیجه تسریع بهبود استخوان آسیب‌دیده است [22]. از نتایج آنالیز عنصری (شکل۳-ج) می‌توان دید که پیک‌های کلسیم، فسفر و اکسیژن که سه عنصر اساسی تشکیل‌دهنده‌ی هیدروکسی‌آپاتیت هستند در ساختار پوشش وجود دارد. شکل (۳-د) نیز نشان می دهدکه توزیع عناصر Ca و P در سطح مورد بررسی یکنواخت است.



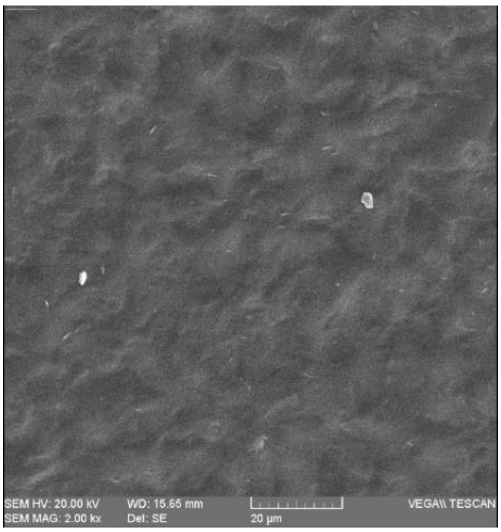
شکل ۲ آنالیز پراش اشعه X، مقایسه نمونه‌ی پوشش داده شده با HA و بدون پوشش



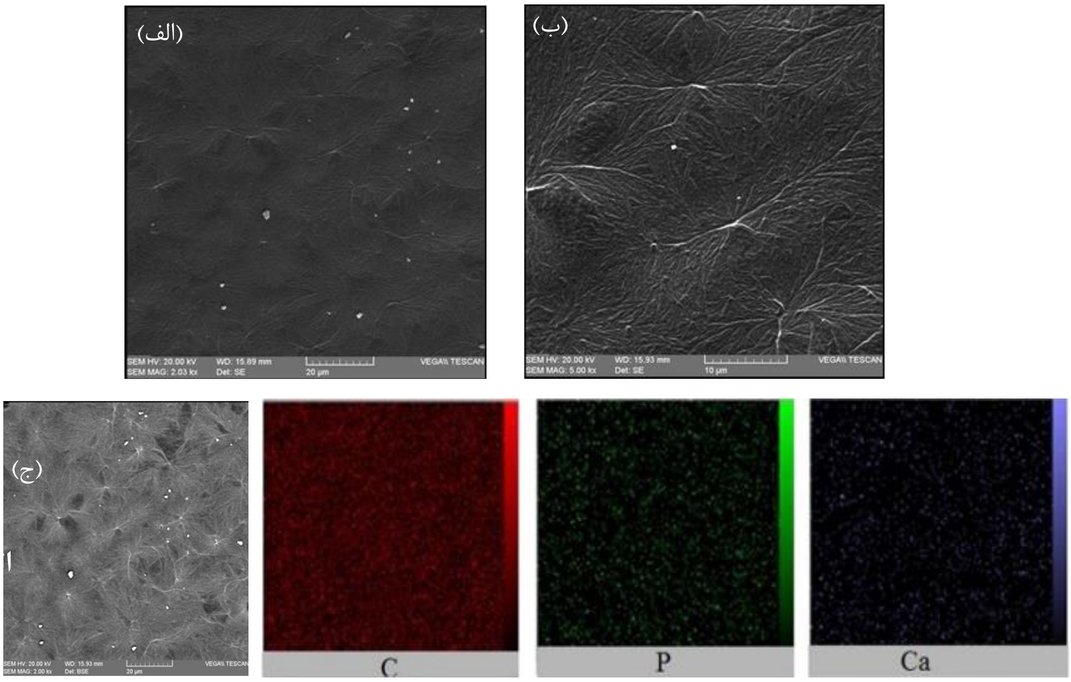
شکل ۳ تصویر SEM از پوشش HA، (الف) ۵۰۰×، (ب) ۱۰۰۰×، (ج) تجزیه عنصری پوشش HA، (د) نقشه عنصری پوشش HA

در شکل (۴) ریزساختار سطح منیزیم با پوشش پلیمری نشان داده شده است. همانطور که مشخص است پوشش بدون تخلخل و ترک، کاملا یکنواخت کل سطح را پوشانده است.

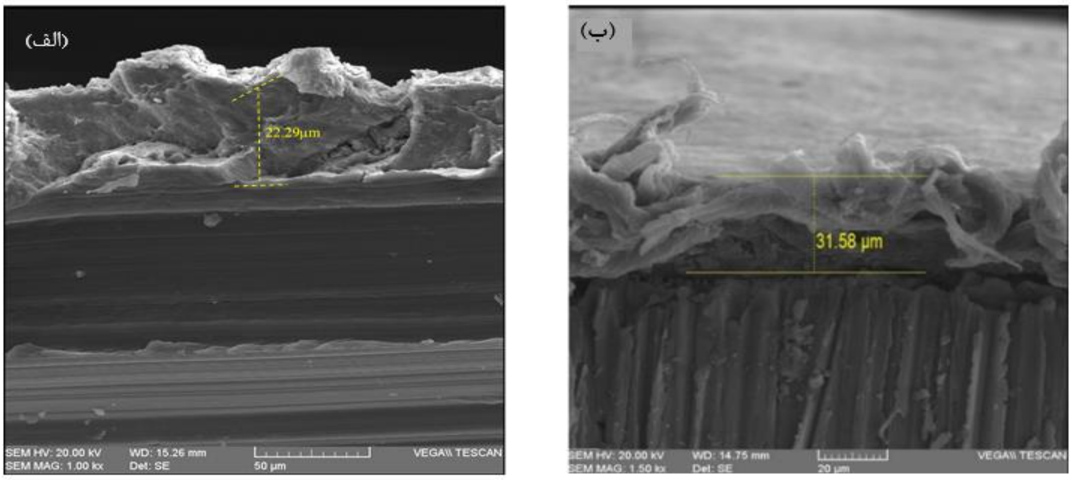
در شکل (۵) ریزساختار و نقشه عنصری منیزیم با پوشش دولایه سرامیکی-پلیمری آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود پوشش کاملا یکنواخت تمام سطح را پوشانده است و پوششی چگال‌تر نسبت به پوشش تک لایه سرامیکی ایجاد می‌شود که باعث می‌شود از تماس با زیرلایه که ممکن بود از طریق تخلخل‌های پوشش هیدروکسی آپاتیت ایجاد شود، جلوگیری کند.



شکل ۴ تصویر SEM از سطح منیزیم با پوشش پلیمری با بزرگنمایی ۲۰۰×



شکل ۵ تصویر SEM از سطح نمونه Mg-HPL با دو بزرگنمایی (الف) ۲۰۰ (ب) ۵۰۰ (ج) نقشه توزیع عنصری



شکل ۶ سطح مقطع عرضی نمونه‌های (الف) Mg-H (ب) Mg-HPL

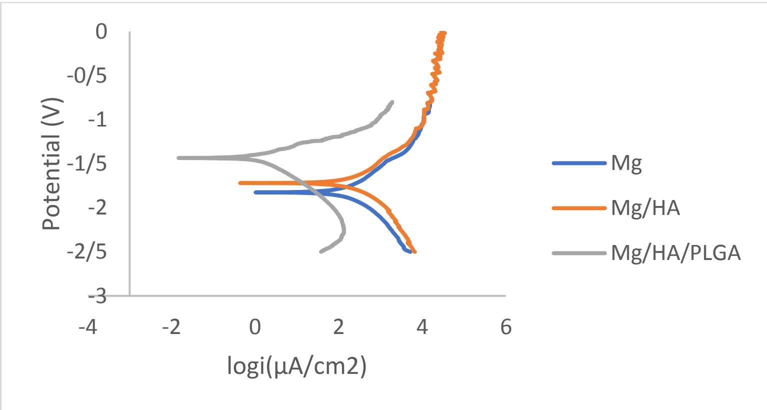
ضخامت پوشش‌ها

شکل (۶) سطح مقطع عرضی نمونه‌های پوشش‌دار Mg-H و Mg-HPL را نشان می‌دهد. ضخامت پوشش بسیار پر اهمیت است و باید حدی بهینه داشته باشد تا علاوه بر کنترل تخریب پذیری زیرلایه و زیست سازگاری آن با بدن، بتواند منجر به اتصال مناسب ایمپلنت با بافت بدن شود [23]. همانطور که در شکل (۶-الف) دیده می‌شود میزان ضخامت پوشش HA حدود ۲۲/۲۹ میکرومتر است و چسبندگی یکنواختی با زیرلایه دارد. ضخامت پوشش دولایه سرامیکی -پلیمری نیز حدود ۳۱/۵۸ میکرومتر است که به دلیل برش ایجاد شده با اره، سطح بالای لایه‌ی پلیمری صاف و یکنواخت نیست و جدایشی بین پوشش و سطح مشاهده می شود (شکل ۶-ب). همانگونه که مشاهده می‌شود لایه بالایی (پلیمر)، بدون هیچگونه ترک یا لایه‌برداری‌ای کاملا به لایه زیرین (سرامیک)، چسبیده است که این یک مورد مهم برای بهبود مقاومت به خوردگی زیرلایه است. ثابت شده است که مقاومت به خوردگی از طریق پوشش‌دهی، متناسب با ضخامت پوشش اعمالی است زیرا لایه ضخیم‌تر و فشرده‌تر، محافظت بیشتری از زیرلایه ایجاد می‌کند [24]. درنتیجه در این

پژوهش ایجاد لایه پلیمری از خوردگی بیشتر منیزیم در مواجهه با محلول حاوی کلر جلوگیری می‌کند.

ارزیابی رفتار خوردگی

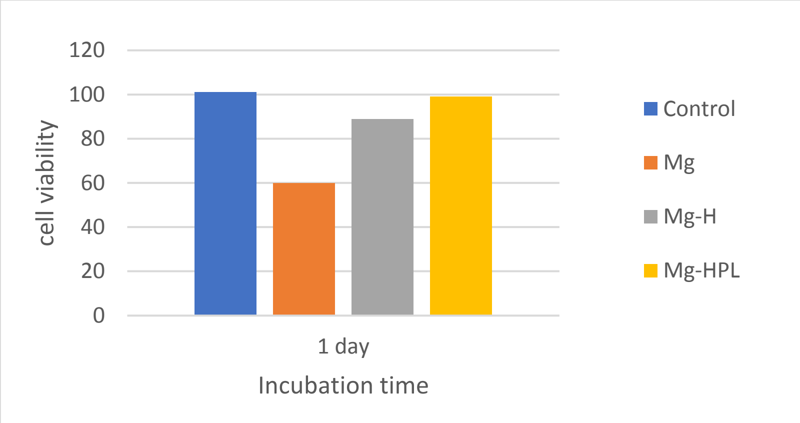
نمودارهای پولاریزاسیون پتانسیودینامیکی نمونه‌های Mg، Mg-H و Mg-HPL در محلول SBF در شکل (۷) مشاهده می شود. مقادیر چگالی جریان خوردگی و پتانسیل خوردگی نمونه‌ها در محلول SBF که به کمک نمودارهای پولاریزاسیون و روش برون یابی تافل تعیین شده در جدول (۱) ارائه شده است. با مقایسه رفتار خوردگی منیزیم با نمونه‌های پوشش داده شده با هیدروکسی‌آپاتیت و پلیمر، مشاهده می شود که چگالی جریان خوردگی منیزیم در محلول SBF بیشتر ازمنیزیم با پوشش هیدروکسی‌آپاتیت و پوشش دولایه هیدروکسی‌آپاتیت و پلیمر به ترتیب است. مقایسه شاخه آندی نمودار پلاریزاسیون نمونه Mg-HPL با نمونه های Mg و Mg-H نشان دهنده افزایش آهسته تر و یکنواخت تر دانسیته جریان خوردگی از پتانسیل آزاد جریان خوردگی (E_{corr}) هست، همچنین تغییر شیب اتفاق افتاده در پتانسیل -۱/۳۷ Vvs.SCE در نمونه Mg-H نشان دهنده شکسته شدن پوشش هیدروکسی آپاتیت است در حالیکه که با اعمال پوشش ثانویه پلیمری بر روی آن، از این اتفاق جلوگیری شده است و شیب یکنواخت تری را شاهد هستیم. همچنین مقایسه شاخه کاتدی نمونه ها، که نشان دهنده نرخ ایجاد گاز هیدروژن است در نمونه Mg-HPL شیب کمتری نسبت به نمونه های Mg و Mg-H نشان می دهد. در مجموع پوشش پلیمری تأثیر قابل توجهی بر مقاومت خوردگی زیر لایهٔ فلزی با پوشش هیدروکسی‌آپاتیت داشته است و چگالی جریان خوردگی زیر لایه فلزی، با پوشش هیدروکسی‌آپاتیت و پوشش دولایه هیدروکسی‌آپاتیت/پلیمر به ترتیب در محلول کاهش یافته است. در واقع جریان خوردگی نمونه بدون پوشش ۲/۳ $\mu A/cm^2$ است که با اعمال پوشش سرامیکی به ۲/۱۹$\mu A/cm^2$ و در نهایت با پوشش دولایه سرامیکی–پلیمری به ۰/۳۷ $\mu A/cm^2$ کاهش یافته است. همچنین پتانسیل خوردگی منیزیم بدون پوشش با اعمال پوشش اولیه سرامیکی از -۱/۸۲ V به -۱/۷۱ V افزایش یافته است و پس از آن با پوشش دولایه سرامیکی–پلیمری افزایش قابل توجه به -۱/۴ V را داشته است.



شکل ۷ نمودار پلاریزاسیون تافل نمونه های فاقد پوشش و پوشش‌داده‌شده در محیط شبیه ساز بدن

جدول ۱ نتایج حاصل از منحنی های پولاریزاسیون در ناحیه تافلی

نمونه	دانسیته جریان i_{corr}(μA/cm2)	پتانسیل خوردگی E_{corr} (V)	شیب کاتدی $-\beta_c$(V.dec^{-1})	شیب آندی βa(V.dec^{-1})
Mg	۲/۳	-۱/۸۲	۰/۳۹	۰/۳۸
Mg-H	۲/۱۹	-۱/۷۱	۰/۴۱	۰/۳۹
Mg-HPL	۰/۳۷	-۱/۴	۰/۳۷	۰/۱



شکل ۸ درصد زنده ماندن سلول‌های استئوبلاست بر حسب زمان در مجاورت با نمونه‌های کنترل، Mg، Mg-H، Mg-HPL

ارزیابی زیستی

نمودار درصد زنده ماندن سلول برای عصاره نمونه‌های Mg، Mg-H و Mg-HPL بعد از گذشت ۲۴ ساعت نسبت به نمونه‌ی کنترل با سلول‌های استئوبلاست انسانی MC3T3 در شکل (۸) نشان داده شده است. با مقایسه‌ی درصد زنده ماندن سلول‌های زنده‌ی نمونه‌ها در زمان‌های مختلف، مشاهده می‌شود که زیست سازگاری منیزیم خالص در زمان ۲۴ ساعت نزدیک ۶۰ درصد، نمونه‌ی با پوشش HA ، ۸۹ درصد و نمونه‌ی با پوشش دولایه، ۹۹ درصد است. بر اساس استاندارد ۵-۱۰۹۳۳-ISO اگر درصد زنده ماندن سلول‌ها بالاتر از ۷۰ درصد باشد، ماده قابلیت سمی بودن ندارد و زیست سازگار است. فرآیند خوردگی سریع منیزیم باعث تشکیل هیدروکسید منیزیم می‌شود و pH محیط را از ۸ بالاتر می برد که خود مانعی برای چسبندگی و تکثیر سلولی است. در نتیجه، اصلاحات سطحی مانند پوشش دهی با کاهش نرخ خوردگی، انتظار می‌رود که پاسخ سلول را بهبود بخشد [25]. به طور کلی عوامل مختلفی از قبیل مقاومت به خوردگی نمونه در محیط بدن، میزان رهایش عناصر موجود، عدم سمیت عناصر تشکیل دهنده و میزان آبدوست بودن بر میزان زیست سازگاری یک آلیاژ تاثیرگذار است. دلیل افزایش زیست سازگاری نمونه‌های با پوشش HA و HA/PLGA به ترتیب نسبت به نمونه‌ی منیزیم خالص را می‌توان به مورفولوژی متخلخل سطح پوشش و آبدوستی بالا نسبت داد. نتایج زیست سازگاری نمونه های Mg-H مطابق با آنچه که شن و همکاران [23] و خو و همکاران [26] هم نشان دادند با حضور HA بهبود یافته است. افزایش زنده مانی سلول در Mg-H عمدتا به دلیل پوشش HA بود که می تواند به طور قابل توجهی آزاد شدن یون منیزیم را در محیط کشت به تاخیر بیندازد. HA ترکیب شیمیایی و ساختاری مشابه با ترکیب معدنی استخوان طبیعی دارد و از آزادسازی Ca^{2+} و PO_4^{3-} در طول هیدرولیز می تواند منجر به تشکیل استخوان جدید گردد. علاوه بر این، یون Ca^{2+} در سیگنال دهی شیمیایی با سلول ها به عنوان عاملی ضروری در نظر گرفته می شود. اگرچه HA خاصیت هدایت استخوانی قوی دارد، اما میزان جذب و حل شدن کم آن در داخل بدن و تردی و شکل متخلخل آن مشکل ایجاد می کند. با ترکیب HA با پلیمرهای آلی مانند PLGA می توان بر این مشکلات غلبه کرد. ترکیب چنین اجزای آلی و غیرآلی یک مسیر مهم و تکاملی برای رشد سطح مشترک آلی-غیرآلی است [27]. این کار را می توان مطابق تحقیق حاضر، با اعمال آنها به صورت لایه به لایه انجام داد.

نتیجه گیری

در این پژوهش، از فلز منیزیم به عنوان زیرلایه استفاده گردید و ابتدا با روش رسوب‌دهی الکتریکی پالسی لایه‌ی اولیه‌ی پوشش یعنی بیوسرامیک هیدروکسی‌آپاتیت روی زیرلایه نشانده شد و پارامترهای بهینه تعیین گردید و پس از آن برای ایجاد پوشش دولایه سرامیکی-پلیمری بر روی منیزیم، نمونه پوشش داده شده با HA در محلول ۱۰٪ وزنی پلی لاکتیک گلایکولیک اسید/دیکلرومتان غوطه‌ور شد و بدین‌گونه لایه‌ی دوم به روش غوطه‌وری نشانده شد. نمونه ها قبل از پوشش‌دهی و در هر مرحله از پوشش، آنالیز فازی و ساختاری شد و مقاومت به خوردگی و زیست‌سازگاری آن ها نیز مشخص گردید. و در

نهایت نتایج حاصل از این تحقیق را می توان به صورت زیر بیان نمود:

۱. پوشش بیوسرامیکی هیدروکسی‌آپاتیت به صورت یکنواخت بر روی سطح منیزیم به روش رسوب‌دهی الکتریکی پالسی ایجاد شد. آنالیز فازی و ریز ساختاری به روش XRD و SEM نشان دهنده تشکیل فاز مناسب HA با مورفولوژی تیغه ای بر سطح منیزیم است.

۲. پوشش دولایه سرامیکی-پلیمری بعد از مرحله اول به روش غوطه‌وری اعمال گردید و به کمک SEM ضخامت پوشش ها به ترتیب برای پوشش سرامیکی تنها و پوشش دولایه۲۲/۲۹ و ۳۱/۵۸میکرومتر تعیین گردید.

۳. آزمون پولاریزاسیون جهت ارزیابی مقاومت به خوردگی انجام شد که طبق نتایج اعمال پوشش دو لایه سبب بهبود مقاومت به خوردگی منیزیم تا حدود هفت مرتبه گردید.

۴. آزمون‌های زیست سازگاری انجام شده بر نمونه های بدون پوشش و پوشش داده شده نیز نشان می دهد که در عصاره تهیه شده از نمونه‌ها سمیتی وجود ندا شته و پوشش دولایه نزدیک‌ترین میزان رشد سلولی را به کنترل در طی ۲۴ ساعت زمان آزمایش دارد.

تقدیر و تشکر

مراجع

[1] J. Chen, Y. Yang, I. P. Etim, L. Tan, K. Yang, R. D. K. Misra, J. Wang, and X. Su, " Recent advances on development of hydroxyapatite coating on biodegradable magnesium alloys: a review", *Materials*, vol. 14, no. 19, pp. 5550, 2021. https://doi.org/10.3390/ma14195550

[2] L. Ling, S. Cai, Q. Li, J. Sun, X. Bao, and G. Xu, "Recent advances in hydrothermal modification of calcium phosphorus coating on magnesium alloy", *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 10, no. 1, pp. 62-80, 2021. https://doi.org/10.1016/j.jma.2021.05.014

[3] V. Yadav, M. Sankar, and L. Pandey, "Coating of bioactive glass on magnesium alloys to improve its degradation behavior: Interfacial aspects", *Journal of Magnesium and Alloys*, vol. 8, no. 4, pp. 999-1051, 2020. https://doi.org/10.1016/j.jma.2020.05.005

[4] R. Karunakaran, S. Ortgies, A. Tamayol, F. Bobaru, and M. P. Sealy, "Additive manufacturing of magnesium alloys", *Bioactive Materials*, vol. 5, no. 1, pp. 44-54, 2020. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.12.004

[5] B. R. Sunil, T. S. Kumar, U. Chakkingal, V. Nandakumar, M. Doble, V. Devi Prasad, and M. Raghunath, "In vitro and in vivo studies of biodegradable fine grained AZ31 magnesium alloy produced by equal channel angular pressing", *Materials Science and Engineering: C*, vol. 59, pp. 356-367, 2016. https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.028

[6] G. Song, "Control of biodegradation of biocompatable magnesium alloys", *Corrosion Science*, vol. 49, no. 4, pp. 1696-1701, 2007. https://doi.org/10.1016/j.corsci.2007.01.001

[7] C. Blawert, W. Dietzel, E. Ghali, and G. Song, "Anodizing treatments for magnesium alloys and their effect on corrosion resistance in various environments", *Advanced Engineering Materials*, vol. 8, no. 6, pp. 511-533, 2006. https://doi.org/10.1002/adem.200500257

[8] C. Wen, X. Zhan, X. Huang, F. Xu, L. Luo, and C. Xia, "Characterization and corrosion properties of hydroxyapatite/graphene oxide bio-composite coating on magnesium alloy by one-step micro-arc oxidation method", *Surface and Coatings Technology*, vol. 317, pp. 121-133, 2017. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.03.034

[9] H. Amiri, I. Mohammadi, and A. Afshar, "Electrophoretic deposition of nano-zirconia coating on AZ91D magnesium alloy for bio-corrosion control purposes", *Surface and Coatings Technology*, vol. 311, pp. 182-190, 2017. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.12.103

[10] W. Liu, Z. Yan, Z. Zhang, Y. Zhang, G. Cai, and Z. Li, "Bioactive and anti-corrosive bio-MOF-1 coating on magnesium alloy for bone repair application", *Journal of Alloys and Compounds*, vol.788, pp. 705-711, 2019. https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.02.281

[11] M. Razavi, M. Fathi, O. Savabi, S. M Razavi, B. H. Beni, D. Vashaee, and L. Tayebi, "Controlling the degradation rate of bioactive magnesium implants by electrophoretic deposition of akermanite coating", *Ceramics International*, vol. 40, no. 3, pp. 3865-3872, 2014. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.08.027

[12] H. Wang, C. Zhao, Y. Chen, J. Li, and X. Zhang, "Electrochemical property and in vitro degradation of DCPD–PCL composite coating on the biodegradable Mg–Zn alloy", *Materials Letters*, vol. 68, pp. 435-438, 2012. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.11.029

[13] M. Tomozawa, S. Hiromoto, and Y. Harada, "Microstructure of hydroxyapatite-coated magnesium prepared in aqueous solution", *Surface and Coatings Technology*, vol. 204, no. 20, pp. 3243-3247, 2010. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2010.03.023

[14] A. Saberi, H.R. Bakhsheshi-Rad, S. Abazari, A.F. Ismail, S. Sharif, S. Ramakrishna, M. Daroonparvar, and F. Berto, "A comprehensive review on surface modifications of biodegradable magnesium-based implant alloy: Polymer coatings opportunities and challenges", *Coatings*, vol. 11, no. 7, pp. 747, 2021. https://doi.org/10.3390/coatings11070747

[15] S. M. Kim, M. H. Kang, H. E. Kim, H. K. Lim, S. H. Byun, J. H. Lee, and S. M. Lee, "Innovative micro-textured hydroxyapatite and poly (l-lactic)-acid polymer composite film as a flexible, corrosion resistant, biocompatible, and bioactive coating for Mg implants" , *Materials Science and Engineering: C*, vol. 81, pp. 97-103, 2017. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.026

[16] Y. F. Zheng, X. N. Gu, and F. Witte, "Biodegradable metals", *Materials Science and Engineering: R: Reports*, vol. 77, pp. 1-34, 2014. https://doi.org/10.1016/j.mser.2014.01.001

[17] L. Xu, and A. Yamamoto, "Characteristics and cytocompatibility of biodegradable polymer film on magnesium by spin coating", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 93, pp. 67-74, 2012. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.12.009

[18] M. Diez, M. H. Kang, S. M. Kim, H. E. Kim, and J. Song, "Hydroxyapatite (HA)/poly-L-lactic acid (PLLA) dual coating on magnesium alloy under deformation for biomedical applications", *Journal of Materials Science: Materials* in Medicine, vol. 27, no. 34, 2016. https://doi.org/10.1007/s10856-015-5643-8

[19] H. Bakhsheshi-Rad, E. Hamzah, M. Abdul-Kadir, S. N. Saud, M. Kasiri-Asgarani, and R. Ebrahimi-Kahrizsangi, "The mechanical properties and corrosion behavior of double-layered nano hydroxyapatite-polymer coating on Mg-Ca alloy", *Journal of Materials Engineering and Performance*, vol. 24, pp. 4010-4021, 2015. https://doi.org/10.1007/s11665-015-1661-4

[20] M. S. Safavi, F. C. Walsh, M. A. Surmeneva, R. A. Surmenev, and J. Khalil-Allafi, "Electrodeposited

hydroxyapatite-based biocoatings: Recent progress and future challenges", *Coatings*, vol. 11, no. 1, pp. 110, 2021. https://doi.org/10.3390/coatings11010110

[21] D. Gopi, J. Indira, and L. Kavitha, "A comparative study on the direct and pulsed current electrodeposition of hydroxyapatite coatings on surgical grade stainless steel", *Surface and Coatings Technology*, vol. 206, no. 11-12, pp. 2859-2869, 2012. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2011.12.011

[22] J. H. Park, Y. K. Lee, K. M. Kim, and K. N. Kim, "Bioactive calcium phosphate coating prepared on H2O2-treated titanium substrate by electrodeposition", *Surface and Coatings Technology*, vol. 195, no. 2-3, pp. 252-257, 2005. https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2004.08.185

[23] H. Bakhsheshi-Rad, E. Hamzah, A. Ismail, M. Aziz, M. Kasiri-Asgarani, E. Akbari, S. Jabbarzare, A. Najafinezhad, and Z. Hadisi, "Synthesis of a novel nanostructured zinc oxide/baghdadite coating on Mg alloy for biomedical application: In-vitro degradation behavior and antibacterial activities", *Ceramics International*, vol. 43, no. 17, pp. 14842-14850, 2017. https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.07.233

[24] X. Gu, W. Zheng, Y. Cheng, and Y. F. Zheng, "A study on alkaline heat treated Mg–Ca alloy for the control of the biocorrosion rate", *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 7, pp. 2790-2799, 2009. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.048

[25] A. Nikbakht, C. Dehghanian, and R. Parichehr, "Silane coatings modified with hydroxyapatite nanoparticles to enhance the biocompatibility and corrosion resistance of a magnesium alloy", *RSC Advances*, vol. 11, no. 42, pp. 26127-26144, 2021. https://doi.org/10.1039/D1RA01018B

[26] L. Xu, F. Pan, G. Yu, L. Yang, E. Zhang, and K. Yang, "In vitro and in vivo evaluation of the surface bioactivity of a calcium phosphate coated magnesium alloy", *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1512-1523, 2009. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.001

[27] M. Rahman, N. K Dutta, and N. R. Choudhury, "Magnesium alloys with tunable interfaces as bone implant materials", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, 2020. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00564